

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA ALBINO BISSON

**POTENCIAIS EFEITOS TÓXICOS DO CÁDMIO EM RIM DE *Rhamdia quelen*
(Pisces, Teleostei)**

CURITIBA

2018

AMANDA ALBINO BISSON

**POTENCIAIS EFEITOS TÓXICOS DO CÁDMIO EM RIM DE *Rhamdia quelen*
(Pisces, Teleostei)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Federal do Paraná como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Professora Doutora Helena
Cristina da Silva de Assis.
Co-orientadora: Doutoranda Maiara Vicentini

CURITIBA

2018

RESUMO

A água é imprescindível para a sobrevivência humana, mas o desenvolvimento econômico e industrial tem causado grandes impactos na qualidade deste recurso. A contaminação do meio hídrico por metais é uma das causas desse problema, sendo o cádmio (Cd) um exemplo importante dessa classe de xenobióticos. O Cd se acumula em vários tecidos de peixes, como fígado, rins e brânquias, e é capaz de alterar diversos parâmetros biológicos destes animais. Este estudo teve como objetivo avaliar os potenciais efeitos tóxicos do Cd no rim posterior de peixes fêmea da espécie *Rhamdia quelen* (Jundiá) expostos subcronicamente a concentrações nominais do metal (0; 0,1; 1; 10 e 100 µg/l) por via hídrica. Para tanto, foram coletadas amostras de rim posterior dos animais expostos em ensaio realizado previamente e foram analisados biomarcadores bioquímicos dos sistemas de biotransformação e antioxidante e de danos oxidativos, assim como um biomarcador de genotoxicidade (ensaio cometa). No grupo exposto à concentração de 1 µg/l, foi observada uma elevação na atividade da enzima glutatona S-transferase (que pode ser decorrente do aumento de espécies reativas de oxigênio ou ainda ativação dos receptores de hidrocarbonetos de arila). Foi também observado aumento na atividade da catalase nos grupos expostos às concentrações 0,1, 1 e 10 µg/l. Não foram observados efeitos estatisticamente significativos nos demais biomarcadores bioquímicos ou no biomarcador de genotoxicidade, o que poderia ser decorrente da ligação de alta afinidade do cádmio à vitelogenina (proteína produzida no fígado de peixes fêmeas jovens), interação que contribuiria para a retenção do metal no fígado dos animais e retardaria sua migração para o rim posterior. No entanto, a análise integrada dos biomarcadores bioquímicos realizada por meio do Índice Integrado de Biomarcadores (IBR) demonstrou que os animais expostos à concentração de 1 µg/l apresentaram maior índice de estresse que os do grupo controle. Estes resultados indicam que o cádmio é capaz de alterar a fisiologia dos organismos expostos, mesmo em baixas concentrações, as quais são permitidas pela legislação brasileira. Desse modo, pode-se inferir que os valores máximos de Cd permitidos na água pela legislação brasileira não são suficientes para garantir a saúde dos peixes, uma vez que podem causar desequilíbrio metabólico nestes organismos.

Palavras-Chave: Biomarcadores. Cádmio. Índice Integrado de Biomarcadores. Jundiá. Metal. Peixes. Rim.

ABSTRACT

Water is indispensable for human survival, but economic and industrial development has caused major impacts on the quality of this resource. The contamination of the aquatic environment with metals is one of the causes of this problem, being cadmium (Cd) an important example of this class of xenobiotics. Cd accumulates in various fish tissues, such as the liver, kidneys and gills, being also capable of modifying several biological parameters in these animals. The aim of this study was to evaluate potential toxic effects of Cd on the posterior kidney of female fish of the *Rhamdia quelen* species (Jundiá) exposed subchronically to four nominal cadmium concentrations (0,1; 1; 10 and 100 µg/l). Posterior kidney samples were collected from animals previously exposed to the metal and biochemical biomarkers of the biotransformation system, antioxidant system and oxidative damage were analyzed, as well as a genotoxic biomarker (comet assay). The group exposed to the concentration of 1 µg/l presented an increase in glutathione S-transferase activity (which may be due to increased production of reactive oxygen species or activation of the aryl hydrocarbon receptors). It was also observed increase in catalase activity in the groups exposed to the concentrations 0,1, 1 and 10 µg/l. Statistically significant effects on the other biochemical biomarkers or genotoxic effects were not observed, which could be due to the high affinity binding of cadmium to vitellogenin (protein produced in the liver of young female fish), an interaction that would contribute to the metal retention in the liver of the animals and would delay its migration to the posterior kidney. However, the integrated analysis of the biochemical biomarkers performed through the Integrated Biomarker Index (IBR) demonstrated that the animals exposed to the concentration of 1 µg/l presented a higher stress index when compared with the control group. This result indicated that cadmium can alter the physiology of exposed organisms, even in low concentrations, which are permitted by brazilian law. Therefore, it can be inferred that the maximum values of Cd allowed in water by brazilian law are not sufficient to ensure fish health, since they may cause metabolic imbalance in these organisms.

Keyword: Biomarkers. Cadmium. Fish. Integrated Biomarker Response Index. Jundiá. Kidney. Metal.

LISTA DE ABREVIATURAS

AhR	-	Receptor de hidrocarbonetos de arila
ARNT	-	Translocador nuclear do receptor hidrocarboneto de arila
BHT	-	Hidroxitolueno butilado
Cd	-	Cádmio
CAT	-	Catalase
CDNB	-	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	-	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CONAMA	-	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	-	5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	-	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EROs	-	Espécies reativas de oxigênio
GPx	-	Glutathione peroxidase
GSH	-	Glutathione reduzida
GSSG	-	Glutathione oxidada
GST	-	Glutathione S-transferase
HCl	-	Ácido clorídrico
IBR	-	Índice integrado de biomarcadores
IP ₃	-	Inositol trifosfato
LPO	-	Lipoperoxidação
NaCl	-	Cloreto de sódio
NADPH	-	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
SOD	-	Superóxido dismutase
TCA	-	Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
1.1	CÁDMIO.....	7
1.2	BIOMARCADORES.....	9
1.2.1	Biomarcadores bioquímicos.....	10
1.2.1.1	Sistema de biotransformação.....	11
1.2.1.2	Sistema antioxidante.....	11
1.2.1.3	Metalotioneínas	13
1.2.1.4	Danos oxidativos.....	13
1.2.2	Biomarcadores de genotoxicidade.....	14
1.3	JUSTIFICATIVA.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	18
3.1.1	Preparação das amostras.....	19
3.1.2	Concentração de proteínas.....	19
3.1.3	Glutathione S-transferase.....	19
3.1.4	Superóxido dismutase.....	20
3.1.5	Catalase.....	20
3.1.6	Glutathione peroxidase.....	21
3.1.7	Glutathione reduzida.....	21
3.1.8	Lipoperoxidação.....	21
3.1.9	Metalotioneínas.....	22
3.1.10	Ensaio cometa.....	22
3.2	ANÁLISE DE DADOS.....	23
4	RESULTADOS.....	24
4.1	PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA E CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO.....	24
4.2	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	24
4.3	BIOMARCADOR DE GENOTOXICIDADE.....	28

4.4	ÍNDICE INTEGRADO DE BIOMARCADORES.....	28
5	DISCUSSÃO.....	30
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso de extrema importância para o ser humano, que, além de consumi-la de forma direta, utiliza-a para diversas atividades econômicas (agricultura, geração de energia elétrica, navegação) e recreacionais (MORAES & JORDÃO, 2002). No entanto, o intenso desenvolvimento econômico e industrial e a exploração desenfreada das fontes hídricas têm contribuído amplamente para sua degradação e do ecossistema aquático como um todo (REMOUNDOU & KOUNDOURI, 2009).

As atividades humanas provocam despejos indevidos de xenobióticos no ambiente aquático, como poluentes orgânicos persistentes (policlorobifenilos, dioxinas, pesticidas organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) (VAN DER OOST *et al.*, 2003) e metais tóxicos (mercúrio, cádmio, chumbo, cromo, entre outros), que são capazes de se bioacumular em tecidos de organismos aquáticos (PRETTO *et al.*, 2014). O cádmio (Cd), metal largamente distribuído no meio hídrico, é altamente tóxico, podendo causar danos aos organismos mesmo estando presente em pequenas quantidades (ALMEIDA *et al.*, 2001). Algumas das alterações causadas por esse e outros xenobióticos nos indivíduos podem ser usadas para avaliar o impacto da poluição aquática na saúde dos componentes desse ecossistema (FREIRE *et al.*, 2008), constituindo uma ferramenta muito útil para a toxicologia ambiental – os biomarcadores.

1.1 CÁDMIO

O cádmio é um contaminante ambiental presente em pigmentos, resíduos de mineração e galvanização, baterias, células fotovoltaicas, fotocondutores e borracha sintética, por exemplo (GUMPU *et al.*, 2015). A exposição crônica a este metal provoca danos principalmente nos rins, pulmões e ossos em humanos (FRIEDMAN & GESEK, 1994; MUSACCHIO, *et al.*, 2017; RAHIMZADEH *et al.*, 2017). Também está relacionado ao desenvolvimento de necrose e neoplasias em ratos e camundongos (ROE *et al.*, 1964; ALI *et al.*, 2012), além de inibir um grande número de sistemas enzimáticos em diversos organismos (SHEN & SANGIAH, 1995; JAMAKALA & RANI, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Este metal é transportado até os rins, onde é reabsorvido e se acumula nos túbulos proximais; assim, a exposição crônica ao cádmio resulta na disfunção renal e comprometimento do sistema de filtração do sangue, como demonstrado em experimentos com camundongos e seres humanos (FRIEDMAN & GESEK, 1994; BOONPRASERT *et al.*, 2018).

Além disso, o contaminante é capaz de interferir no sistema de defesa antioxidante em peixes, como evidenciado por Pereira (2014), que observou os efeitos do Cd por meio de biomarcadores em peixes machos da espécie *Rhamdia quelen* (Jundiá). Essa interferência no sistema antioxidante, decorrente do aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, pode resultar em danos estruturais (como lipoperoxidação e carbonilação de proteínas). Pesquisadores demonstraram, por meio de estudos com moluscos bivalves da espécie *Bathymodiolus azoricus*, um aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase nas brânquias de indivíduos expostos ao cádmio (BEBIANO *et al.*, 2009), enquanto Bouraoui e colaboradores (2008) observaram que a retenção do metal no fígado de peixes da espécie *Sparus aurata* (conhecido popularmente como Dourado) causou elevação da atividade da enzima glutathione-S-transferase e na concentração de metalotioneínas. Este último estudo permitiu ainda constatar que o acúmulo do cádmio no organismo é proporcional à concentração do metal no meio e ao tempo de exposição ao qual o indivíduo foi submetido.

Peixes sofrem contaminação por cádmio por meio da ingestão de alimentos contaminados ou pela absorção do cádmio presente na água através das brânquias (PRETTO *et al.*, 2010). Nestes animais, o cádmio tem efeitos no crescimento (provoca hipocalcemia, prejudicando o desenvolvimento ósseo) (LINS *et al.*, 2010), no metabolismo, na imunidade e na eficiência reprodutiva (ALMEIDA *et al.*, 2001), além de afetar enzimas responsáveis pela eficácia da neurotransmissão e por outros processos bioquímicos (metabolização de xenobióticos e defesa antioxidante) e fisiológicos básicos (como alterações nos níveis de alguns íons – Ca^{+2}) (WRIGHT & WELBOURN, 1994; HOLLIS *et al.*, 1999).

Gill & Pant (1983), por meio de estudos com peixes da espécie *Puntius conchoni* (conhecido como Barbo rosado), verificaram que a exposição crônica (90 dias) ao Cd provocou alterações metabólicas nos animais, como

hipoglicemia aguda e hipocolesterolemia acentuada. Estes efeitos metabólicos, assim como outros efeitos fisiológicos e bioquímicos podem ser observados mesmo quando os animais são expostos a concentrações subletais do metal, o que torna as enzimas envolvidas nesses processos bioquímicos biomarcadores confiáveis para avaliar a toxicidade do cádmio (DE LA TORRE *et al.*, 2000).

1.2 BIOMARCADORES

Biomarcadores são respostas biológicas quantificáveis adaptativas a estressores (NASCIMENTO *et al.*, 2006) que permitem relacionar a exposição a um xenobiótico e seu efeito tóxico no indivíduo (DE CASTRO & JONSSON, 2012). Cabe ressaltar que biomarcadores são diferentes de bioindicadores – bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, abundância e condições podem ser modificadas em resposta a contaminantes e outras condições ambientais (DOS SANTOS, 2013). Por isso, os bioindicadores são muito importantes na avaliação e no monitoramento da qualidade do meio em que estão inseridos (DE CASTRO & JONSSON, 2012).

Vários parâmetros biológicos podem ser usados como biomarcadores, pois, segundo Amorim (2003, p. 161), “Biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde”. Desse modo, pode-se utilizar parâmetros moleculares (variações nas sequências de ácidos nucleicos e proteínas), bioquímicos (atividades enzimáticas e antioxidantes não-enzimáticos), morfológicos (desestruturação celular, vacuolização, esteatose, necrose e apoptose), genéticos (quebras no DNA, aberrações cromossômicas e micronúcleos), imunológicos (componentes das imunidades inata e adaptativa – sistema complemento, imunoglobulinas –, ativação de células do sistema imunológico) e fisiológicos (taxa respiratória, frequência cardíaca, níveis iônicos no plasma, temperatura corporal e índices hematimétricos) para avaliar a exposição a contaminantes (RYAN & HIGHTOWER, 1996; HANDY & DEPLEDGE, 1999; JEMEC *et al.*, 2009; DURAMAD & HOLLAND, 2011; COIMBRA *et al.*, 2013; MUSSALI-GALANTE *et al.*, 2013; ROSSI *et al.*, 2016). O presente trabalho será baseado principalmente em análises de biomarcadores

bioquímicos e de genotoxicidade, por isso, estes serão tratados com maiores detalhes.

1.2.1 Biomarcadores bioquímicos

Os biomarcadores bioquímicos são muito utilizados para detectar ou avaliar os efeitos subletais de contaminantes em peixes (ALMEIDA *et al.*, 2002), uma vez que estes animais respondem prontamente a xenobióticos como o cádmio por meio de alterações em suas enzimas dos sistemas de biotransformação e antioxidante (ALMEIDA *et al.*, 2009).

O uso da atividade de enzimas como biomarcador é possível porque os compostos nocivos apresentam uma elevada afinidade por pares de elétrons presentes nos aminoácidos que compõem estas proteínas (como os grupos sulfidríla) (BERTIN & AVERBECK, 2006). O cádmio, por exemplo, possui alta afinidade para grupamentos tiol presentes nas moléculas proteicas (SUWALSKY *et al.*, 2004). Quando essas substâncias se ligam às enzimas, as proteínas sofrem modificações estruturais e perdem sua conformação original, o que pode resultar na alteração ou mesmo perda da sua atividade enzimática. Os testes para avaliação de atividades enzimáticas são, portanto, de grande importância e utilidade, sendo muito usados para acompanhar o funcionamento de enzimas de estresse oxidativo (COGO *et al.*, 2009).

Estudos indicam que o cádmio é capaz de interferir na atividade de enzimas da fase I (citocromo P450) e da fase II (glutathione S-transferase) de biotransformação (BOURAOUI *et al.*, 2008), além de induzir a expressão de proteínas de ligação a metais, as metalotioneínas (SURESH *et al.*, 2015), e aumentar a ativação de sistemas antioxidantes presentes, principalmente, no fígado e no rim dos peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) (EROGLU *et al.*, 2015). Dessa forma, observa-se que os biomarcadores bioquímicos podem ser ferramentas úteis na avaliação dos efeitos do cádmio em peixes.

1.2.1.1 Sistema de biotransformação

Este sistema compreende as enzimas de fase I e II do metabolismo (PEREIRA, 2014). A fase I é responsável por tornar os xenobióticos mais hidrofílicos para facilitar sua excreção pela urina (PAMPLONA, 2009). Para tanto, nessa etapa ocorrem reações de oxidação, redução e hidrólise, catalisadas por enzimas microsossomais monooxigenases (GARCIA, 2016), como a superfamília CYP450. Durante a fase II, ocorre a conjugação biossintética (NASCIMENTO *et al.*, 2006), na qual os compostos resultantes da fase I são conjugados com outras moléculas, como aminoácidos, glutathiona reduzida (GSH) ou outros grupamentos químicos (acetilação, glicuronidação, metilação e sulfatação) (VICENTINI, 2017).

A glutathiona S-transferase (GST) é uma enzima que catalisa a conjugação da GSH a compostos eletrofílicos, que podem ser intermediários do sistema de biotransformação ou radicais de oxigênio (PRETTO, 2010). Sua atividade neutralizadora das espécies reativas de oxigênio é de extrema importância para o sistema antioxidante (BAYSOY *et al.*, 2012). A GST tem sido utilizada para monitoramento da contaminação por metais, uma vez que estes são capazes de inibir sua atividade por desestabilizarem as membranas lisossomais, o que provoca liberação de íons ácidos e radicais que prejudicam a ação da enzima (COGO, 2009). No entanto, em altas concentrações, o cádmio é capaz de elevar a atividade da GST hepática, o que pode ser explicado pela diferente ação do metal em diferentes isoformas da enzima (PEREIRA, 2014).

1.2.1.2 Sistema antioxidante

Alguns contaminantes ambientais, como o cádmio, podem levar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ALMEIDA, 2009) (FIGURA 1). Essas espécies podem causar danos aos tecidos e devem, portanto, ser neutralizadas pelo sistema antioxidante, o qual é composto por fatores enzimáticos (SOD, CAT, GPx) e não-enzimáticos (GSH) (VICENTINI, 2017). No entanto, a produção de EROs pode sobrepor a capacidade do

Sabe-se que o cádmio é capaz de afetar o sistema antioxidante de diversos organismos, causando, por exemplo, depleção nos níveis de GSH e alterações nas enzimas desse sistema (CHANDRAN *et al.*, 2005), além de ser capaz de promover geração de EROs (ŽIKIĆ *et al.*, 2001). Em um estudo utilizando *Oreochromis mossambicus* (Tilápia de Moçambique), Basha & Rani (2003) observaram uma elevação na atividade das enzimas SOD e GPx nos primeiros dias de exposição ao cádmio (7 a 15 dias de exposição), tanto no fígado quanto nos rins dos peixes. Esse aumento agudo indica que estas enzimas podem atuar como uma primeira linha de defesa contra o metal.

1.2.1.3 Metalotioneínas

As metalotioneínas são proteínas citosólicas de baixo peso molecular, ricas em cisteína e, por isso, capazes de se ligarem a metais, auxiliando no seu transporte (BOURAOU *et al.*, 2008). Elas estão relacionadas a homeostase de metais essenciais ao organismo, como zinco e cobre, e detoxificação de metais tóxicos (MUSSALI-GALANTE *et al.*, 2013), além de que podem atuar na defesa antioxidante sequestrando e eliminando radicais livres intracelulares (BEBIANO *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2015). Outras funções sugeridas às metalotioneínas são adaptação ao estresse, ação antiapoptótica e regulação do crescimento neuronal (ROMERO-ISART & VAŠÁK, 2002). A expressão dessas proteínas é induzida pelo aumento do aporte de metais na célula (MUTO *et al.*, 1999), sendo que diferentes isoformas são induzidas por diferentes metais (MUSSALI-GALANTE *et al.*, 2013). Por isso, as metalotioneínas são biomarcadores específicos para a contaminação por metais, o que as torna muito úteis na toxicologia ambiental (FREIRE, 2008).

1.2.1.4 Danos oxidativos

Como comentado anteriormente, quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e a ação das defesas antioxidantes do organismo ocorre o estresse oxidativo. Nessa situação, as espécies reativas podem reagir com componentes celulares e causar vários danos estruturais a proteínas e membranas biológicas (STARK, 2005). A lipoperoxidação (LPO) é um desses

danos, e se trata de uma reação em cadeia auto-perpetuante (ALMEIDA, 2002). O radical hidroxila (OH^\cdot) consegue retirar um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares, gerando hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (WELCH *et al.*, 2002), que, na presença de íons ferro, serão então convertidos nos radicais altamente reativos LO^\cdot e LO_2^\cdot , os quais dão início a uma nova cascata de reações (BARBOSA *et al.*, 2010). Essas reações acabam por alterar a estrutura e, conseqüentemente, a função das membranas celulares, modificando a fluidez da bicamada lipídica e causando até mesmo o comprometimento de sua integridade (PEREIRA, 2014). Estudos com *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) já demonstraram que o cádmio é capaz de provocar lipoperoxidação no fígado de animais expostos ao metal em um período sub-crônico (15 dias) (ALMEIDA *et al.*, 2009).

1.2.2 Biomarcadores de genotoxicidade

Outra classe de biomarcadores muito útil na avaliação dos efeitos de xenobióticos nos organismos é a dos biomarcadores de genotoxicidade, os quais permitem observar se a exposição ao contaminante causa danos ao material genético (como mutações, danos cromossômicos ou lesões nas fitas de DNA). Para tanto, podem ser realizados ensaios de identificação de aberrações cromossômicas, micronúcleo, troca de cromátides-irmãs e ensaio cometa, por exemplo (VALENTE *et al.*, 2017).

O ensaio cometa permite identificar diversos tipos de danos ao material genético, como quebras em fitas simples ou duplas de DNA, detecção de sítiosapurínicos e apirimidínicos (loais do DNA em que estão ausentes bases purínicas – adenosina e guanina – ou pirimídicas – citosina, timina e uracila –, respectivamente) e bases fragmentadas, entre outras lesões provocadas pelo estresse oxidativo (DEMARINI, 2013). Nesse ensaio, após a ruptura das membranas celulares, as células a serem avaliadas são submetidas a uma eletroforese em matriz de agarose em que é possível observar a extensão dos danos ao material genético (fragmentos pequenos de DNA migram mais rápido que os grandes, formando uma “cauda” de cometa; quando não há fragmentação as fitas de DNA ficam intactas e migram em conjunto, não havendo formação da cauda) (BRIANEZI *et al.*, 2009; PEREIRA, 2014).

Uma das vantagens desse ensaio é a necessidade de um pequeno número de células para sua execução; além disso, quebras no DNA ocorrem rapidamente após a exposição a agentes genotóxicos, o que permite avaliar uma resposta do organismo em um breve intervalo de tempo (FRENZILLI *et al.*, 2009).

1.3 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que metais, como o cádmio, são contaminantes muito presentes no ambiente aquático (GUMPU *et al.*, 2015). Estudos aplicando o espectrofotômetro de absorção atômica para avaliação da concentração de Cd na água do submédio São Francisco, trecho do rio cercado por diversas indústrias e centros urbanos na divisa entre Petrolina (PE) e Juazeiro (BA), evidenciaram níveis de Cd que variavam de 0,006 a 0,012 mg /l, dependendo do período do ano em que a amostra foi coletada (período 1: setembro a dezembro, em que a precipitação média foi de 200 mm; período 2: janeiro a março, precipitação média de 3 mm) (SOUZA *et al.*, 2016).

A presença de metais tóxicos em altas concentrações (como as evidenciadas pelo estudo de Souza e colaboradores (2016), por exemplo) é extremamente prejudicial aos organismos que habitam este meio, sendo capaz de alterar suas funções fisiológicas e mesmo comportamentais (ALMEIDA *et al.*, 2009). Peixes, que estão constantemente expostos a esses xenobióticos, podem ingeri-los por meio de alimentos contaminados ou absorvê-los através das brânquias (PRETTO *et al.*, 2010).

Rhamdia quelen é um peixe nativo da América do Sul, habitando rios desde o sul do México até o centro da Argentina (PRETTO *et al.*, 2011). É uma espécie onívora que possui hábitos noturnos, habitando preferencialmente o fundo de rios, onde o ambiente é mais calmo e escuro (VICENTINI, 2017). É também muito adaptável, sendo capaz de sobreviver invernos frios e se reproduzir rapidamente durante o verão, o que favorece sua criação comercial (PAMPLONA, 2009). Devido a sua importância econômica e facilidade de cultivo, *R. quelen* tem sido muito utilizada em estudos para avaliar os efeitos tóxicos de herbicidas (CRESTANI *et al.*, 2007; GLUSCZAK *et al.*, 2007; DE MENEZES *et al.*, 2011; MELA *et al.*, 2013a; MURUSSI *et al.*, 2015; MURUSSI *et al.*, 2016), pesticidas (GHISI *et al.*, 2011), fármacos, como dipirona (PAMPLONA *et al.*,

2011), diclofenaco (GHELFI *et al.*, 2016; GUILOSKI *et al.*, 2017a) e paracetamol (GUILOSKI *et al.*, 2017b), e metais, como tório (CORREA *et al.*, 2008; KOCHHANN *et al.*, 2009), cobre (MELA *et al.*, 2013b), chumbo (MUÑOZ *et al.*, 2015), zinco (LEITEMPERGER *et al.*, 2016) e cádmio (PRETTO *et al.*, 2010; PRETTO *et al.*, 2011; PEREIRA, 2014; PRETTO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2016; VICENTINI, 2017). Alguns pesquisadores têm empregado larvas de *R. quelen* para esta finalidade (BENADUCE *et al.*, 2008; SOBJAK *et al.*, 2017), mas a maioria dos estudos utiliza-se de indivíduos jovens e de ambos os sexos para suas análises. Alguns pesquisadores usaram apenas indivíduos do sexo masculino em seus experimentos (PEREIRA, 2014; PEREIRA *et al.*, 2016; GUILOSKI *et al.*, 2017a; GUILOSKI *et al.*, 2017b), mas há poucos estudos que avaliam o efeito de xenobióticos exclusivamente em fêmeas (VICENTINI, 2017). Pelo exposto acima e pela questão reprodutiva (o Cd pode afetar as funções metabólicas do animal e prejudicar o desenvolvimento de seus embriões, por exemplo), torna-se interessante avaliar os efeitos do cádmio em fêmeas da espécie *R. quelen*.

Outro aspecto a ser considerado é que, depois de absorvidos, os metais são então transportados até os rins, onde podem se acumular. Estudos com peixes da espécie *Dicentrarchus labrax* (Robalo), por exemplo, demonstraram que o Cd foi capaz de se acumular no rim posterior (o qual possui função de excreção, enquanto o rim anterior ou cranial está mais relacionado a hematopoese) dos animais (ROMÉO *et al.*, 2000). Logo, é importante analisar os efeitos do Cd em biomarcadores no rim posterior de *R. quelen*, buscando compreender melhor os mecanismos pelos quais o metal provoca efeitos tóxicos nas células e de que modo o organismo se defende contra esse xenobiótico. Além disso, as diferentes concentrações de Cd utilizadas no bioensaio (0,1; 1; 10 e 100 µg/l) foram escolhidas levando-se em consideração os valores máximos do metal permitidos pela legislação brasileira – CONAMA (1 e 10 µg/l), o que permite avaliar se os limites estipulados são suficientes para garantir a saúde dos peixes expostos ao Cd.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os potenciais efeitos tóxicos do cádmio no rim posterior de peixes fêmea da espécie *Rhamdia quelen* (Jundiá) expostos subcronicamente ao metal por via hídrica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar possíveis alterações renais de peixes fêmea da espécie *Rhamdia quelen* (Jundiá) expostos subcronicamente ao cádmio por via hídrica utilizando biomarcadores dos sistemas de biotransformação e antioxidante.

Avaliar possíveis danos lipídicos e de DNA no rim posterior de peixes fêmea da espécie *Rhamdia quelen* (Jundiá) expostos subcronicamente ao cádmio por via hídrica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Amostras de rim coletadas de 50 peixes da espécie *Rhamdia quelen* (Jundiá) expostos ao cádmio por via hídrica foram utilizadas. Os animais foram expostos a quatro concentrações nominais de cádmio: 0,1; 1; 10 e 100 µg/l, escolhidas com base na legislação (1 µg/l é o limite para águas de classe I e II e 10 µg/l é o limite para águas de classe III, ambos estabelecidos pelo CONAMA na Resolução 357/2005) (CONAMA, 2005). Cada grupo foi composto por 10 animais, e no grupo controle não houve adição de cádmio na água. Esses animais foram mantidos em tanques de cor escura, com capacidade para 100 litros (densidade de 10 animais por tanque), com aeração constante, temperatura controlada (26 ± 2 °C) e fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro.

A concentração da solução de cádmio usada nos grupos teste foi de 400 mg/l e foi adicionada a água do aquário em um bioensaio semi-estático (a cada 24 horas 1/3 da água total do aquário foi trocada, com a reposição total da concentração inicial do xenobiótico). O tempo e a quantidade de reposição do contaminante foram estipulados com base nos dados obtidos por Wiltemburg (2012).

Os parâmetros de qualidade da água (nitrito, oxigênio dissolvido, amônia e pH) foram avaliados por kits Labcon®.

De cada aquário foram coletados 50 ml da água em diferentes momentos no decorrer do experimento (tempos de exposição 0 horas, 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias) para a quantificação de cádmio por meio da espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry – ICP-OES).

Após o período subcrônico de 15 dias de exposição, os peixes foram anestesiados (benzocaína 1%) e eutanasiados, e o rim posterior foi coletado. As amostras foram então congeladas e armazenadas a -80° C.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob o nº 912.

3.1.1 Preparação das amostras

Um fragmento de aproximadamente 100 mg de rim posterior foi homogeneizado em 1 ml de tampão fosfato de potássio pH 7,0 (0,1 M) (respeitando uma proporção de 1:10), e a solução foi centrifugada a 15.000 xg, por 30 minutos e a 4° C. O sobrenadante foi então aliquoteado para as análises dos biomarcadores GST, SOD, CAT, GPx, GSH e LPO, além da quantificação de proteína total nas amostras.

Para a análise das metalotioneínas, aproximadamente 30 mg de rim posterior foram homogeneizados em 300 µl de tampão Tris-HCl/sacarose pH 8,6 (20 mM/500 mM) (respeitando uma proporção de 1:10). A solução também foi centrifugada a 15.000 xg, por 30 minutos e a 4° C., e o sobrenadante foi armazenado.

3.1.2 Concentração de proteínas

A concentração de proteínas totais nas amostras foi quantificada seguindo o método descrito por Bradford (1976), diluindo-se cada amostra em tampão fosfato de potássio pH 7,0 (proporção de 1:20). Para a análise de metalotioneínas a diluição seguiu uma proporção de 1:30 com o tampão de homogeneização. Para a quantificação proteica de todas as amostras, foram adicionados 250 µl da solução de Bradford, e cerca de 10 µl das amostras foram colocados em placa para que suas absorbâncias fossem lidas no espectrofotômetro (620 nm). Foi gerada uma curva utilizando soro de albumina bovina (BSA) como padrão para que fosse possível determinar a concentração de proteínas nas amostras.

3.1.3 Glutathione S-transferase

A avaliação da atividade da glutathione S-transferase foi realizada com base no método elaborado por Keen *et al.* (1976), o qual tem como princípio o aumento da absorbância lida pelo espectrofotômetro devido a formação de um tioéter quando a GST catalisa a reação de conjugação de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione reduzida (GSH). Para isso, os

sobrenadantes recolhidos das amostras de rim posterior após a homogeneização foram diluídos para que atingissem uma concentração de 2 mg de proteína/ml. Em uma microplaca, foram aplicados 20 µl de cada amostra, aos quais foram acrescentados 180 µl de uma solução reação contendo GSH (3 mM), CDNB (3 mM) e tampão fosfato de potássio pH 6,5 (0,1M). Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a cada 15 segundos (durante 3 minutos) em espectrofotômetro (340 nm).

3.1.4 Superóxido dismutase

A análise da atividade da superóxido dismutase foi realizada com base no método descrito por Gao *et al.* (1998). Este tem como base a capacidade da SOD de inibir a auto-oxidação do pirogalol, reagente fotossensível empregado na análise. Para tanto, 20 µl de cada amostra foram diluídos em tampão fosfato de potássio pH 7,0 (proporção de 1:10). Dessas amostras diluídas, foram separadas duas alíquotas de 40 µl (uma das alíquotas serviu de controle, enquanto a outra foi utilizada para o teste propriamente dito). A ambas as alíquotas foram adicionados 885 µl de tampão Tris/EDTA pH 8,0 (1 M/5 mM) e 50 µl de pirogalol, mas apenas a alíquota teste foi incubada por 30 minutos. Para parar a reação, 25 µl de HCl (1N) foram adicionados aos tubos contendo tanto as amostras teste quanto as do controle. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (440 nm) com 300 µl das amostras teste e controle.

3.1.5 Catalase

A avaliação da atividade da catalase baseou-se no método descrito por Aebi (1984), cujo princípio é o consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima, gerando O_2 e H_2O , o que causa um decréscimo na leitura da absorbância em espectrofotômetro. Para isso, foram pipetados em uma microplaca 5 µl de cada amostra pura, aos quais foram acrescentados 295 µl de uma solução de H_2O_2 (20 mM). A leitura da absorbância no espectrofotômetro (240 nm) foi feita a cada 15 segundos durante 1 minuto.

3.1.6 Glutathione peroxidase

Para realizar a análise da atividade da glutathione peroxidase foi utilizado o método descrito por Hafeman *et al.* (1974). Este se baseia na medida do decréscimo de absorbância lida pelo espectrofotômetro promovido pela redução da glutathione oxidada (GSSG) a GSH por meio da ação da glutathione reductase e na presença de NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional a produção de GSSG a partir de GSH pela GPx na presença de H_2O_2 .

Foram pipetados 10 μ l de cada amostra pura a uma microplaca, aos quais foram adicionados 130 μ l de uma solução de reação contendo tampão fosfato de sódio pH 7,0 (0,1 M), azida sódica (3,0769 mM), NADPH (0,3077 mM), GSH (3,0769 mM) e glutathione reductase (1,54 U/ml). A azida sódica inibe a atividade da catalase e evita a degradação do H_2O_2 , mantendo-o disponível para a reação catalisada pela GPx. Após 2 minutos, uma solução de H_2O_2 (1,5 mM) foi adicionada. A leitura da absorbância no espectrofotômetro (340 nm) foi realizada imediatamente (a cada 15 segundos e durante 3 minutos).

3.1.7 Glutathione reduzida

A concentração de GSH foi mensurada com base no método de Sedlak & Lindsay (1968). Em alíquotas de 100 μ L de amostra foram adicionados 25 μ L de ácido tricloroacético a 50% (TCA), que provocou a precipitação das proteínas e sua separação da GSH. Após centrifugação a 10000 xg, por 10 minutos, 25 μ L de amostra, 115 μ L de tampão Tris Base (0,4 M e pH 8,9) e 10 μ L de DTNB (5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico a 2,5 mM) foram pipetados em microplaca. Essas amostras foram lidas em espectrofotômetro (405 nm).

3.1.8 Lipoperoxidação

Esta análise foi realizada utilizando o ensaio FOX, método descrito por Jiang *et al.* (1992), que se baseia na oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos em condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} – laranja de xilenol na presença de um estabilizador (hidroxitolueno butilado – BHT), que absorve luz a 550-570 nm. Para isso, as amostras foram ressuspensas em metanol

(respeitando uma proporção de 1:1) e centrifugadas a 5000 xg, por 5 minutos. Foram coletados 100 µl do sobrenadante, os quais foram transferidos para novos tubos, onde houve adição de 900 µl de uma solução reação contendo xilenol (0,1 mM), BHT (4 mM), sulfato ferroso amoniacal (2,5 mM), ácido sulfúrico (25 mM) e metanol 90%. Os tubos foram então incubados durante 30 minutos em local protegido da luz. Após esse período, 300 µl do conteúdo de cada tubo foram pipetados em uma microplaca para a leitura da absorbância em espectrofotômetro (560 nm).

3.1.9 Metalotioneínas

A avaliação da concentração de metalotioneínas foi feita com base no método descrito por Viarengo *et al.* (1997), que tem como princípio a determinação do conteúdo de sulfidrilas presentes nas metalotioneínas. Para essa finalidade, 300 µl de cada amostra foram colocados em tubos, aos quais foram adicionados 342 µl de uma solução contendo etanol absoluto e clorofórmio. Os tubos foram centrifugados (6000 xg, por 10 minutos) e 490 µl do sobrenadante resultante foram recolhidos, transferidos para um novo tubo – ao qual foram acrescentados 1502 µl de uma solução contendo HCl e etanol – e mantidos em -20°C por 60 minutos. Estes também foram centrifugados (6000 xg, por 10 minutos) e seu sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuscitado com 1000 µl de uma solução de etanol, clorofórmio e tampão Tris-HCl, e centrifugado (6000 xg, por 10 minutos). O pellet foi ressuscitado com uma solução de NaCl e EDTA sódico e foram adicionados 1000 µl da solução de Ellman (DTNB, metanol e tampão fosfato de sódio/NaCl pH 8,0 (0,2 M/2 M)). Foi realizada nova centrifugação (3000 xg, por 5 minutos), e 300 µl do sobrenadante obtido foram transferidos para microplaca para leitura da absorbância no espectrofotômetro (412 nm).

3.1.10 Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado pelo laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental da UFPR com base no método de Speit e Hartmann (2005) adaptado por Ramsdorf *et al.* (2009). Para tanto, uma porção do rim

posterior de cada peixe foi homogeneizada em soro bovino fetal. Foram adicionados 20 µl dessa solução a agarose de baixo ponto de fusão, e depositados em uma lâmina revestida com agarose, as quais ficaram 24 h expostas a uma solução de lise contendo NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), tampão Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (1%), triton X100 (1%) e DMSO (10%), protegidas da luz e a 4° C. A desnaturação do DNA foi feita com uma solução de NaOH/EDTA (10 N/ 200 mM, pH 13,0) para que fosse possível realizar a eletroforese (300 mA, 1 V, durante 25 minutos). As lâminas passaram por neutralização (com HCl Tris 0,4 M, pH 7,5), fixação em etanol absoluto e coloração com brometo de etídio (0,02 g/ml). Para avaliação da fragmentação do material genético foi usada a microscopia de epifluorescência (ampliação de 400x), sendo que 100 nucleoides foram analisados de acordo com o comprimento da cauda do cometa – foram atribuídos valores de 0 (nucleoide intacto) a 4 (COLLINS *et al.*, 1997).

3.2 ANÁLISE DE DADOS

Para analisar os dados provenientes dos biomarcadores bioquímicos e do biomarcador de genotoxicidade, individualmente, foram realizados testes de Levenne e Shapiro-Wilk para testar os pressupostos de homogeneidade das variâncias e normalidade, respectivamente. Os dados foram então submetidos aos testes de Análise de Variância unifatorial (ANOVA) ou teste de Kruskal-Wallis, de acordo com os pressupostos. As análises foram realizadas com regra de decisão de $p < 0,05$.

Para a análise integrada dos biomarcadores bioquímicos foi utilizado o Índice Integrado de Biomarcadores (IBR) proposto por Sanchez *et al.* (2013). O IBR permite comparar as médias e desvios de cada grupo (cada tratamento diferente) com os do controle. Como os dados do grupo controle servem de valor basal, o IBR possibilita observar o quanto os tratamentos aplicados modificaram as respostas normais dos biomarcadores. O índice de estresse gerado pelo IBR fornece um valor numérico que representa este desvio da condição de equilíbrio do organismo.

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA E CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO

Os valores (média \pm erro padrão) dos parâmetros de qualidade da água foram todos considerados adequados para a manutenção do ensaio, sendo eles: nitrito ($1,19 \pm 0,26$ ppm), oxigênio dissolvido ($5,24 \pm 0,99$ ppm), amônia tóxica ($<1,5$ ppm) e pH ($6,7 \pm 0,02$).

Não foi detectada a presença de Cd na água dos aquários do grupo controle e do grupo exposto à concentração de $0,1 \mu\text{g/l}$, uma vez que o limite de detecção do método empregado é de $1 \mu\text{g/l}$. No aquário que recebeu o tratamentos de $1 \mu\text{g/l}$ de Cd, a concentração média total do metal (\pm erro padrão) foi de $1,75 (\pm 0,16) \mu\text{g/l}$. No de $10 \mu\text{g/l}$ o valor obtido foi de $18,68 (\pm 2,29) \mu\text{g/l}$, enquanto no de $100 \mu\text{g/l}$, este valor foi de $187,90 (\pm 28,22) \mu\text{g/l}$. A fim de facilitar a interpretação, a descrição dos resultados será feita utilizando as concentrações nominais.

4.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Não foi observada diferença significativa na atividade das enzimas SOD (FIGURA 3) e GPx (FIGURA 4) e na concentração de GSH (FIGURA 5), hidroperóxidos (FIGURA 6) e metalotioneínas entre os tratamentos (FIGURA 7).

FIGURA 3 – ATIVIDADE DA SOD EM RIM POSTERIOR DE FÊMEAS DE *Rhamdia quelen* EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO POR 15 DIAS. RESULTADOS AVALIADOS POR ANOVA E EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO ($p = 0,0792$).

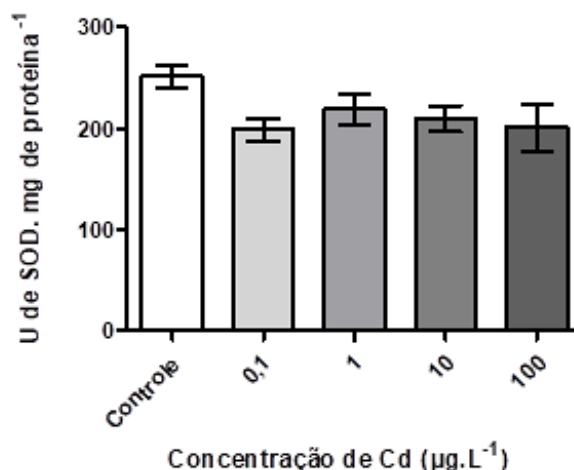


FIGURA 4 – ATIVIDADE DA GPx EM RIM POSTERIOR DE FÊMEAS DE *Rhamdia quelen* EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO POR 15 DIAS. RESULTADOS AVALIADOS POR KRUSKAL-WALLIS E EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO ($p = 0,1931$).

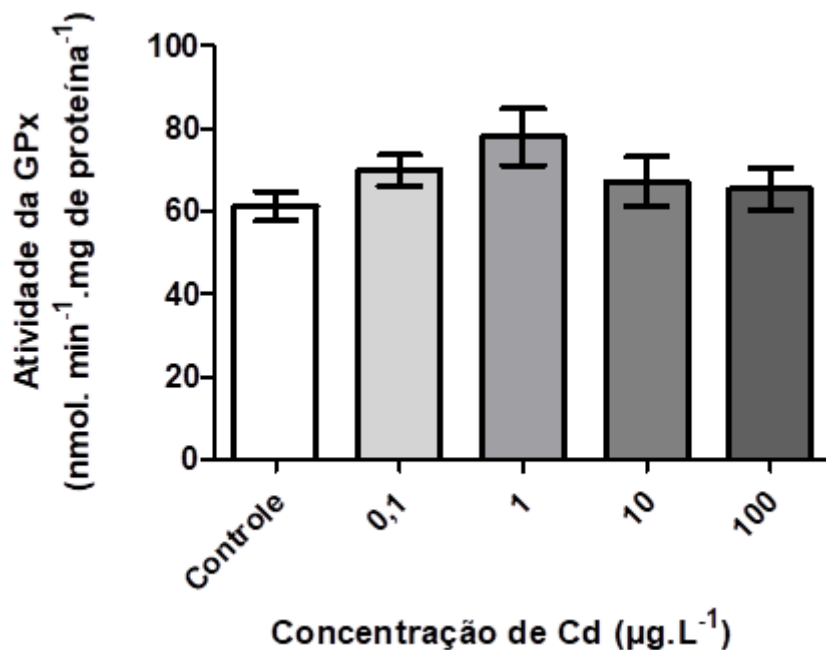


FIGURA 5 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM RIM POSTERIOR DE FÊMEAS DE *Rhamdia quelen* EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO POR 15 DIAS. RESULTADOS AVALIADOS POR KRUSKAL-WALLIS E EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO ($p = 0,061$).

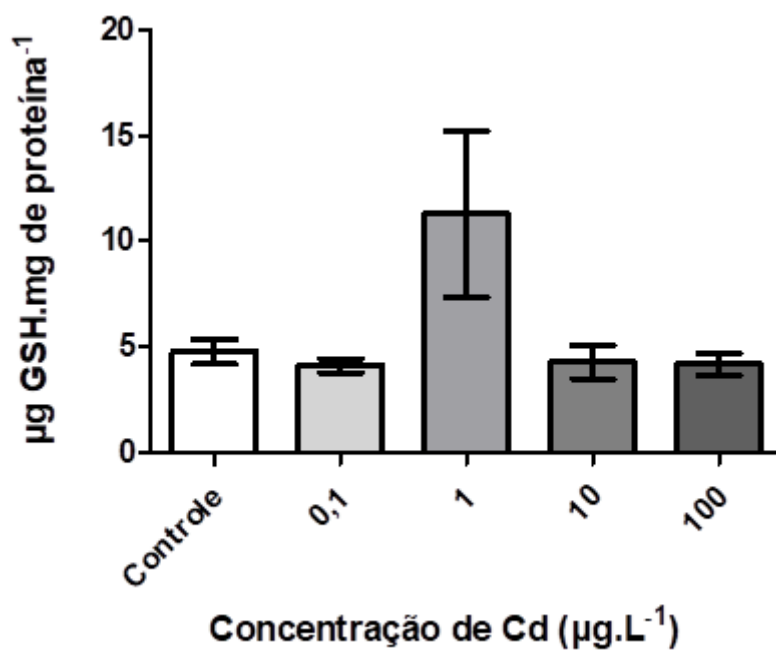


FIGURA 6 – CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS EM RIM POSTERIOR DE FÊMEAS DE *Rhamdia quelen* EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO POR 15 DIAS. RESULTADOS AVALIADOS POR KRUSKAL-WALLIS E EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO ($p = 0,4580$).

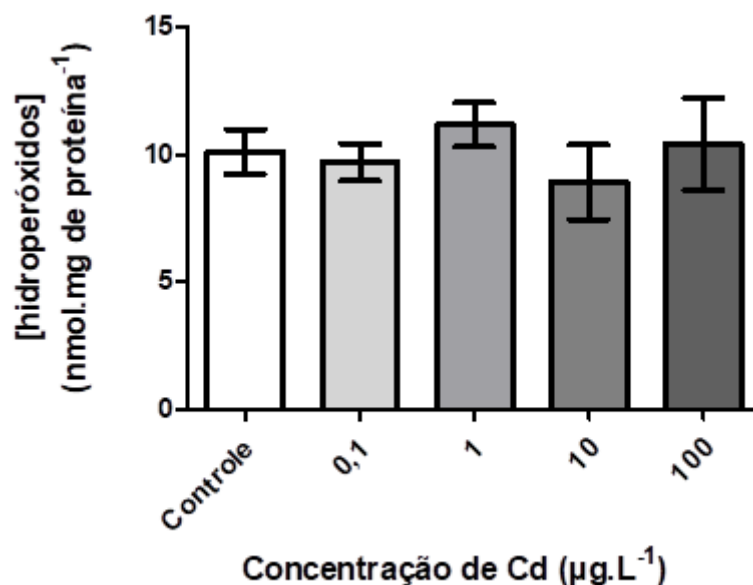
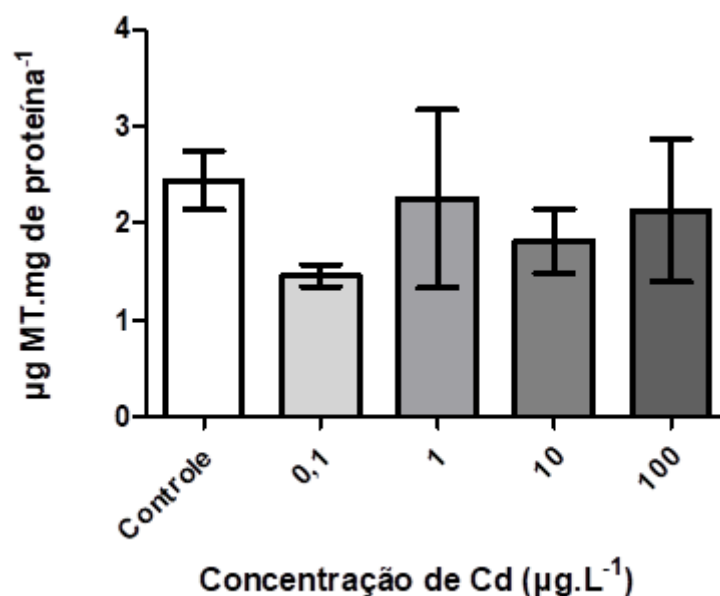


FIGURA 7 – CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS EM RIM POSTERIOR DE FÊMEAS DE *Rhamdia quelen* EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO POR 15 DIAS. RESULTADOS AVALIADOS POR KRUSKAL-WALLIS E EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO ($p = 0,3877$).



Foi observado um aumento na atividade da GST no grupo de 1 $\mu\text{g/l}$ em relação ao grupo controle (FIGURA 8). Também houve aumento na atividade da CAT (FIGURA 9) nos grupos submetidos às concentrações 0,1 $\mu\text{g/l}$, 1 $\mu\text{g/l}$ e 10 $\mu\text{g/l}$ em relação ao controle.

FIGURA 8 – ATIVIDADE DA GST EM RIM POSTERIOR DE FÊMEAS DE *Rhamdia quelen* EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO POR 15 DIAS. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$). RESULTADOS AVALIADOS POR ANOVA E EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO ($p = 0,0061$).

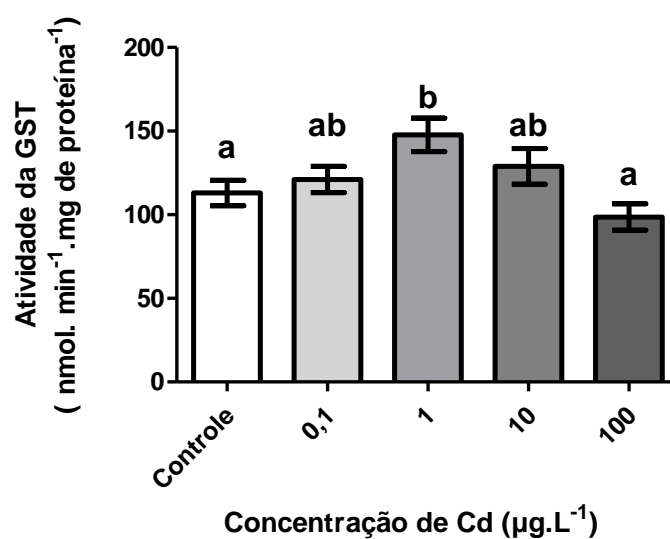
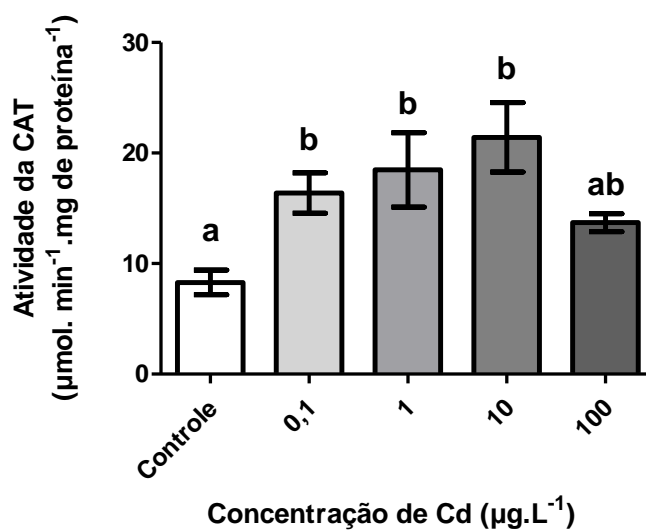


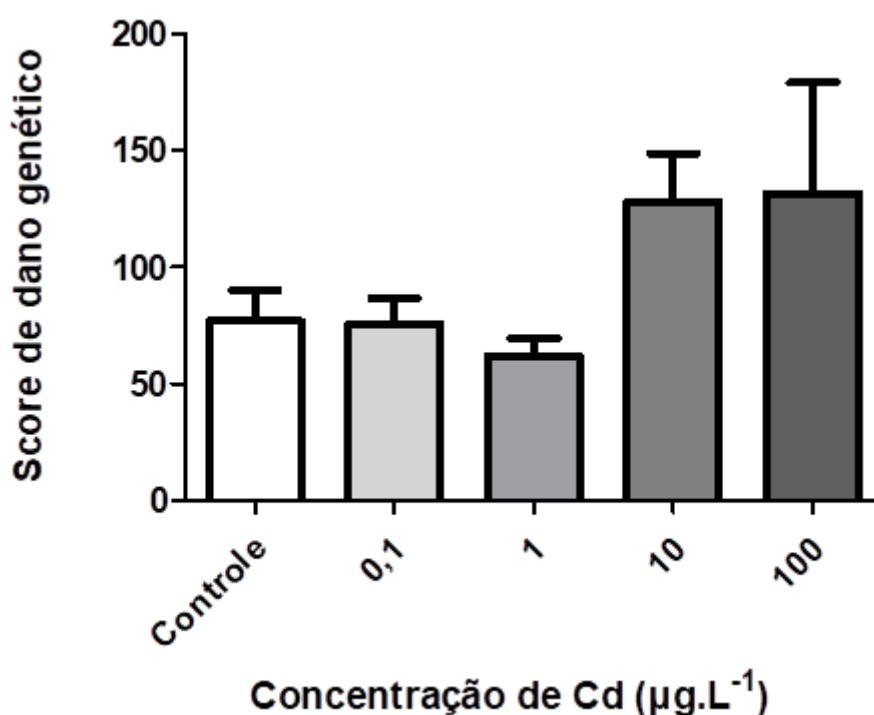
FIGURA 9 – ATIVIDADE DA CAT EM RIM POSTERIOR DE FÊMEAS DE *Rhamdia quelen* EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO POR 15 DIAS. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$). RESULTADOS AVALIADOS POR KRUSKAL-WALLIS E EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO ($p = 0,001$).



4.3 BIOMARCADOR DE GENOTOXICIDADE

O cádmio não mostrou genotoxicidade quando avaliado pelo ensaio cometa, não havendo diferença entre o score de danos (FIGURA 10).

FIGURA 10 – DANOS NO DNA EM CÉLULAS DE RIM POSTERIOR DE FÊMEAS DE *Rhamdia quelen* EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO POR 15 DIAS. RESULTADOS AVALIADOS POR ANOVA E EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO ($p = 0,1437$).



4.4 ÍNDICE INTEGRADO DE BIOMARCADORES

Os valores de média e desvio padrão obtidos no grupo controle de cada biomarcador bioquímico foram considerados valores basais e utilizados na determinação do IBR (FIGURA 11). Os resultados obtidos na análise do IBR para cada concentração de cádmio utilizada no ensaio são mostrados na Tabela 1, sendo que o grupo exposto à concentração de 1 $\mu\text{g/l}$ teve o maior índice de estresse (IBR = 9,1786) comparado com o controle.

FIGURA 11 – ÍNDICE INTEGRADO DE BIOMARCADORES (IBR) ORGANIZADO A PARTIR DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA OS BIOMARCADORES GST, SOD, CAT, GPX, GSH, LIPOPEROXIDAÇÃO E METALOTIONEÍNAS EM RIM POSTERIOR DE FÊMEAS DE *Rhamdia quelen* EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO POR 15 DIAS. A ÁREA REPRESENTADA ACIMA DE 0 (CONTROLE, LINHA AZUL) REFLETE O AUMENTO DO BIOMARCADOR, ENQUANTO A ÁREA ABAIXO DA LINHA DO CONTROLE INDICA A REDUÇÃO DO BIOMARCADOR.

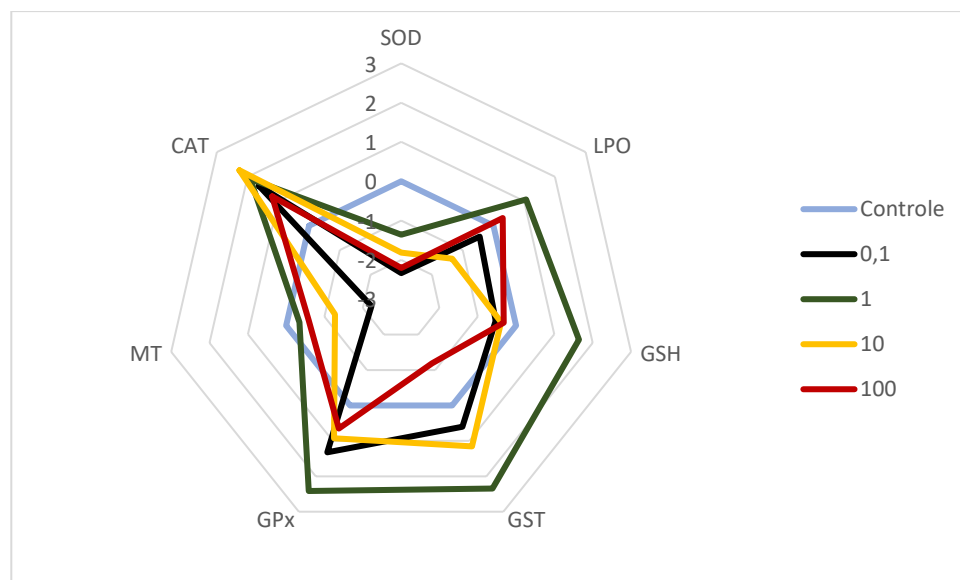


TABELA 1 – ÍNDICE INTEGRADO DE BIOMARCADORES (IBR) PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO AS QUAIS FORAM EXPOSTAS AS FÊMEAS DE *Rhamdia quelen*.

Concentração de cádmio	IBR
0,1 µg/l	7,4631
1 µg/l	9,1786
10 µg/l	6,9055
100 µg/l	5,2660

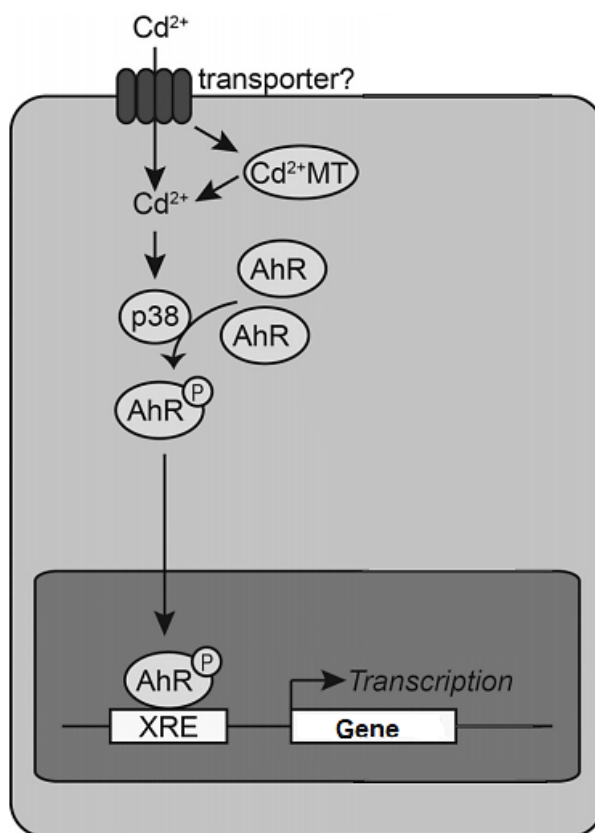
5 DISCUSSÃO

O cádmio é um contaminante ambiental capaz de provocar diversos danos à saúde de uma ampla gama de organismos. Estudos com peixes já demonstraram seu potencial hepatotóxico e nefrotóxico (OMER *et al.*, 2012). Alguns pesquisadores já evidenciaram que o Cd é capaz de provocar danos no funcionamento renal de machos de *R. quelen* (PEREIRA, 2014). O presente estudo procurou avaliar potenciais efeitos nefrotóxicos deste metal em fêmeas de *Rhamdia quelen* por meio de biomarcadores bioquímicos (enzimas e componentes não-enzimáticos dos sistemas de biotransformação e antioxidante) e de genotoxicidade (ensaio cometa).

Um aumento na atividade da glutathione S-transferase renal foi observado, evidenciando seu importante papel no combate de espécies reativas de oxigênio. Não foi possível observar elevações nos níveis de glutathione reduzida, o que pode ter ocorrido devido ao seu consumo pela GST.

Esta elevação na atividade da GST pode ser decorrente não apenas em resposta ao aumento de EROs, mas também pela ativação dos receptores de hidrocarbonetos de arila (AhR) (VAN DER OOST *et al.*, 2003; SANTOS, 2013). Estes receptores são proteínas citosólicas que, ao se ligarem a seus agonistas, migram para o núcleo da célula e se associam ao translocador nuclear do receptor hidrocarboneto arila (ARNT), atuando então como fatores de transcrição de genes de algumas enzimas do sistema de biotransformação, como enzimas da família do citocromo P450 e a GST, por exemplo (ELBEKAI & EL-KADI, 2004). Kido e colaboradores (2014) propuseram que o cádmio é capaz de ativar esses receptores Ah por meio da ativação da proteína quinase p38, que facilita a entrada do receptor no núcleo por meio de sua fosforilação (FIGURA 12).

FIGURA 12 – ATIVAÇÃO DO RECEPTOR Ah PELO CÁDMIO POR MEIO DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA p38.



FONTE: Adaptado de Kido *et al.* (2014)

Também foi detectado um aumento na atividade da catalase, outra enzima cuja função é proteger o organismo dos potenciais danos causados pelas EROs. Em ensaios com o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, Zeng e colaboradores (2012) expuseram os organismos ao cádmio e obtiveram resultados que geraram um gráfico com formato semelhante ao obtido neste trabalho – em ambos a atividade da catalase gerou uma curva cujo formato foi descrito pelos autores como formato de sino. No presente estudo, a atividade da catalase foi aumentando progressivamente nas concentrações 0,1 µg/l, 1 µg/l e 10 µg/l, tornando a diminuir na maior concentração empregada no ensaio – 100 µg/l. Esse comportamento pode ser resultante da oxidação da enzima na maior concentração, o que alteraria sua estrutura e poderia prejudicar seu funcionamento (ROMERO-PUERTAS *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2018).

Embora não tenham sido evidenciadas muitas alterações no funcionamento das enzimas dos sistemas de biotransformação e antioxidante, pode-se perceber que as poucas respostas provocadas pelo cádmio no rim posterior das fêmeas de *R. quelen* (aumento das atividades da GST e da catalase) foram capazes de prevenir maiores danos no rim posterior dos animais, uma vez que não foi observado aumento nos índices de lipoperoxidação (concentração de hidroperóxidos) ou de danos ao DNA.

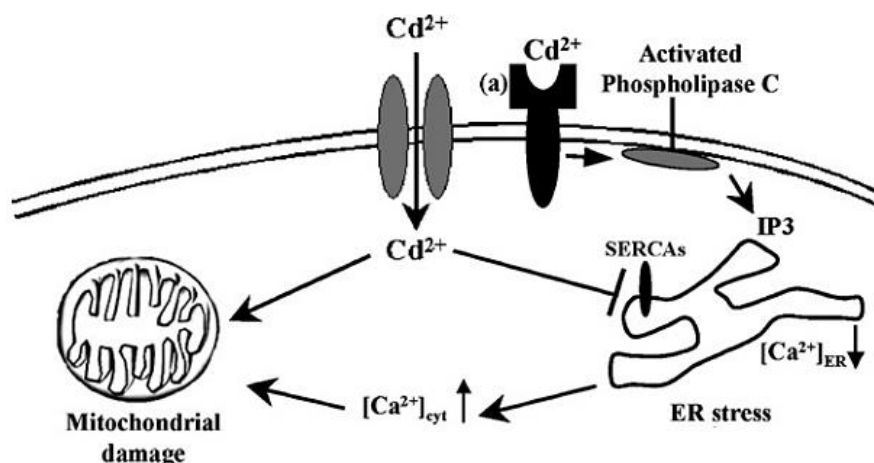
Entretanto, essa aparente ausência de danos pode ser decorrente do pouco contato do metal com o tecido renal – para machos de jundiá, em um tempo de exposição de 15 dias foi possível detectar efeitos nefrotóxicos, uma vez que o Cd promoveu alterações nos biomarcadores bioquímicos no rim posterior (PEREIRA, 2014), mas para as fêmeas esse período pode não ter sido suficiente. Isso porque o cádmio se liga com alta afinidade à vitelogenina (proteína produzida no fígado de peixes fêmeas jovens), interação que poderia manter o metal no fígado dos animais e retardar sua migração para o rim posterior (PEDRO *et al.*, 2015). Como os peixes usados no presente estudo estavam em fase de desenvolvimento, sugere-se que a produção de vitelogenina no fígado estivesse elevada, o que contribuiria para a retenção do cádmio no tecido hepático (VICENTINI, 2017).

Além disso, no ensaio para avaliar a genotoxicidade não houve diferenciação e contabilização de cometas em que ocorreu processo apoptótico. Logo, a ausência de danos ao material genético pode estar relacionada ao processo de morte celular programada, no qual, embora não haja quebra de DNA, há perda de tecido saudável e funcional (VICENTINI, 2017).

Outro aspecto interessante a ser observado é o de que não foram constatadas alterações significativas na atividade da superóxido dismutase, enzima que faz a remoção catalítica de um radical de oxigênio, gerando H_2O_2 . Logo, o H_2O_2 que serve de substrato da catalase deve ser proveniente de outra fonte. Sabe-se que o cádmio é capaz de aumentar os níveis intracelulares de cálcio (inibe as SERCAs – ATPases transportadoras de cálcio do retículo endoplasmático – e estimula a via de liberação de Ca^{+2} mediada por IP_3) (BIAGIOLI *et al.*, 2008), e estudos indicam que a alteração na quantidade desse íon causa um desequilíbrio mitocondrial - altos níveis de cálcio estimulam a

cadeia respiratória, levando à formação de maiores quantidades de EROs (WANG *et al.*, 2008; SON *et al.*, 2010; GÖRLACH *et al.*, 2015) (FIGURA 13).

FIGURA 13 – VIAS PELAS QUAIS O CÁDMIO PROVOCA A LIBERAÇÃO DE Ca^{2+} DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E CAUSA DESEQUILÍBRIO MITOCONDRIAL.



FONTE: Adaptado de Biagioli *et al.* (2008).

Outra possível fonte de H_2O_2 é a atividade de outras enzimas produtoras de EROs não abordadas neste estudo, como a aldeído oxidase. Esta enzima converte aldeídos em ácidos na presença de O_2 e água, formando também H_2O_2 (MANEVSKI *et al.*, 2014; FOTI, 2017). A atividade desta e de outras enzimas semelhantes poderia sofrer alguma modificação após a administração do cádmio, favorecendo a formação de radicais de oxigênio.

Embora não tenham sido observados diferenças significativas provocados pelo cádmio nos demais biomarcadores bioquímicos, ao observar os resultados fornecidos pelo IBR é possível notar que os maiores índices de estresse (maior desequilíbrio na resposta normal dos biomarcadores) foram obtidos com as concentrações 0,1 $\mu\text{g/l}$, 1 $\mu\text{g/l}$ e 10 $\mu\text{g/l}$, sendo que o maior valor foi obtido com a concentração de 1 $\mu\text{g/l}$ – concentração de cádmio que o CONAMA permite que esteja presente na água bruta. Com isso, pode-se inferir que os valores máximos de cádmio permitidos na água pela legislação brasileira não são baixos o suficiente para garantir a saúde dos peixes, uma vez que são capazes de alterar o equilíbrio e o funcionamento normal dos organismos em questão.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição de fêmeas de *Rhamdia quelen* ao cádmio por via hídrica durante um período de 15 dias (sub-crônico) causou alterações nas atividades das enzimas GST e CAT do rim posterior dos animais nas concentrações de 0,1 µg/l, 1 µg/l e 10 µg/l. Embora não tenham sido observadas alterações provocadas pelo metal nos demais biomarcadores, foi possível notar, por meio do IBR, que os animais expostos à concentração de 1 µg/l tiveram um desequilíbrio maior na resposta normal dos biomarcadores do que os do grupo controle. Desse modo, infere-se que o cádmio, mesmo em baixas concentrações, oferece riscos à saúde dos peixes, já que é capaz de alterar a fisiologia destes organismos.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALI, I.; DAMDIMOPOULOU, P.; STENIUS, U.; ADAMSSON, A.; MÄKELÄ, S. I.; ÅKESSON, A.; BERGLUND, M.; HÅKANSSON, H.; HALLDIN, K. Cadmium-Induced Effects on Cellular Signaling Pathways in the Liver of Transgenic Estrogen Reporter Mice. **Toxicological Sciences**, v.127, n. 1, p. 66-75, fev. 2012.
- ALMEIDA, J. A.; NOVELLI, E. L. B.; DAL PAI SILVA, M.; ALVES JÚNIOR, R. Environmental cadmium exposure and metabolics responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environmental Pollution**, v. 114, n. 2, p. 169-175, set. 2001.
- ALMEIDA, J. A.; DINIZ, Y. S.; MARQUES, S. F. G.; FAINE, L. A.; RIBAS, B. O. BUMEIKO, R. C.; NOVELLI, E. L. B. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environment International**, v. 27, n. 8, p. 673-679, mar. 2002.
- ALMEIDA, J. A.; BARRETO, R. E.; NOVELLI, E. L. B.; CASTRO, F. J.; MORON, S. E. Oxidative stress biomarkers and aggressive behavior in fish exposed to aquatic cadmium contamination. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 103-108, mar. 2009.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 6, n. 2, p.158-170, jun. 2003.
- ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology and Pharmacology**, v.145, n. 2, p. 282-287, mar. 2007.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, jul./ago. 2010.
- BASHA, P. S.; RANI, A. U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 2, p. 218-221, out. 2003.
- BAYSOY, E.; ATLI, G.; GÜRLER, C. Ö.; DOGAN, Z.; EROGLU, A.; KOCALAR, K.; CANLI, M. The effects of increased freshwater salinity in the bioavailability of metals (Cr, Pb) and effects on antioxidant systems of *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 249-253, out. 2012.
- BEBIANO, M. J.; COMPANY, R.; SERAFIM, A.; CAMUS, L.; COSSON, R. P.; FIALA-MÉDONI, A. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus*

azoricus from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. **Aquatic Toxicology**, v. 75, n. 4, p. 354-373, nov. 2005.

BENADUCE, A. P. S.; KOCHHANN, D.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Toxicity of Cadmium for Silver Catfish *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) Embryos and Larvae at Different Alkalinities. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 2, p. 274-282, fev. 2008.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1549-1559, nov. 2006.

BIAGIOLI, M.; PIFFERIA, S.; RAGGHIANIA, M.; BUCCIA, S.; RIZZUTOB, R.; PINTON, P. Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis. **Cell Calcium**, v. 43, n. 2, p.184-195, fev. 2008.

BOURAOUI, Z.; BANNI, M.; GHEDIRA, J.; CLERANDEAU, C.; GUERBEJ, H.; NARBONNE J. F.; BOUSSETTA, H. Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 201-207, set. 2008.

BOONPRASERT, K.; VESEY, D. A.; GOBE, G. C.; RUENWEERAYUT, R.; JOHNSON, D. W.; NA-BANGCHANG, K.; SATARUG, S. Is renal tubular cadmium toxicity clinically relevant? **Clinical Kidney Journal**, sfx153, p. 1-7, fev. 2018.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, mai. 1976.

BRIANEZI, G.; DE CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.45, n.4, p. 325-334, ago. 2009.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A. A.; MOHANDASS, S.; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 140, n. 3/4, p. 422-426, mar./abr. 2005.

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, Santa Teresa, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.

COIMBRA, R. S. C.; DOS SANTOS, C. R.; SARAIVA, V. B.; OLIVEIRA, M. M. Biomarcadores como ferramentas na avaliação da qualidade do pescado contaminado com metais traço. **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego**, Campos dos Goytacazes, v. 7, n. 1, p. 153-172, jan./jun. 2013.

COLLINS, A.; DUSINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RASLOVÁ, K.; VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, n. 2, p. 139-146, jun.1997.

CONAMA, (Conselho Nacional do Meio Ambiente). CONAMA 357/05, Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005. **Ministério do Meio Ambiente**.

CORREA, L. M.; KOCHHANN, D.; BECKER, A. G.; PAVANATO, M. A.; LLESUY, S. F.; LORO, V. L.; RAABE, A.; MESKO, M. F.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Biochemistry, cytogenetics and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 4, p. 250-256, jul. 2008.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, A.; GONÇALVES, F. F.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere**, v. 67, n. 11, p. 2305-2311, mai. 2007.

DeMARINI, D. M. Genotoxicity biomarkers associated with exposure to traffic and near-road atmospheres: a review. **Mutagenesis**, v. 28, n 5, p. 485-505, set. 2013.

DE CASTRO, V. L. S. S.; JONSSON, C. M. Proposta conceitual de estudo para a integração e gerenciamento do uso de marcadores bioquímicos de contaminação ambiental. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 1, p. 159-170, mar 2012.

DE LA TORRE, F. R.; SALIBIÁN, A.; FERRARI, L. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. **Environmental Pollution**, v. 109, n. 2, p. 277-282, ago. 2000.

DE MENEZES, C. C.; DA FONSECA, M. B.; LORO, V. L.; SANTI, A.; CATTANEO, R.; CLASEN, B.; PRETTO, A.; MORSCH, V. M. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 665-671, mai. 2011.

DURAMAD, P.; HOLLAND, N. T. Biomarkers of Immunotoxicity for Environmental and Public Health Research. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 5, p. 1388-1401, mai. 2011.

ELBEKAI, R. H.; EL-KADI, A. O. S. Modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated gene expression by arsenite, cadmium, and chromium. **Toxicology**, v. 202, n. 3, p. 249-269, out. 2004.

EROGLU, A.; DOGAN, Z.; KANAK, E. G.; ATLI, G.; CANLI, M. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3229-3237, mar. 2015.

FOTI, A. **Characterization of the human aldehyde oxidase: studies on the FAD active site and ROS generation**. 159 f. Dissertação (Doutorado em Bioquímica e Biologia) – Faculdade de Matemática e Ciências Naturais, de Potsdam, Potsdam, 2017.

FREIRE, M. M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S. F.; ARIAS, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p.347-354, 2008.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 80-92, jan./fev. 2009.

FRIEDMAN, P. A.; GESEK, F. A. Cadmium Uptake by Kidney Distal Convuluted Tubule Cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 128, n. 2, p. 257-263, out. 1994.

GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41-45, mar. 1998.

GARCIA, D. P. **Metabolismo do Malondialdeído em peixes: Implicações na avaliação da peroxidação lipídica como biomarcador de contaminação aquática**. 91 f. (Mestrado em Química) – Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2016.

GHELFI, A.; RIBAS, J. L. C.; GUILOSKI, I. C.; BETTIM, F. L.; PIANCINI, L. D. S.; CESTARI, M. M.; PEREIRA, A. J.; SASSAKI, G. L.; DE ASSIS, H. C. S. Evaluation of Biochemical, Genetic and Hematological Biomarkers in a Commercial Catfish *Rhamdia quelen* Exposed to Diclofenac. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 49-54, jan. 2016.

GHISI, N. C.; RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; DE ALMEIDA, M. I. M.; RIBEIRO, C. A. O; CESTARI, M. M. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, n 1/4, p. 589-599, set. 2011.

GILL, T. S.; PANT, J. C. Cadmium toxicity: Inducement of changes in blood and tissue metabolites in fish. **Toxicology Letters**, v. 18, n. 3, p. 195-200, set. 1983.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; MORAES, B. S.; SIMÕES, R. R.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*).

Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 146, n. 4, p. 519-524, nov. 2007.

GOMES, M. P.; DE BRITO, J. C. M.; BICALHO, E. M.; SILVA, J. G.; GOMIDES, M. F.; GARCIA, Q. S.; FIGUEREDO, C. C., Ciprofloxacin vs. temperature: Antibiotic toxicity in the free-floating liverwort *Ricciocarpus natans* from a climate change perspective. **Chemosphere**, v. 202, p. 410-419, jul. 2018.

GÖRLACH, A.; BERTRAMA, K.; HUDECOVA, S.; KRIZANOVAC, O. Calcium and ROS: A mutual interplay. **Redox Biology**, v. 6, p. 260-271, dez. 2015.

GUILOSKI, I. C.; PIANCINI, L. D. S.; DAGOSTIM, A. C.; CALADO, S. L. M.; FÁVARO, L. F.; BOSCHEN, S. L.; CESTARI, M. M.; DA CUNHA, C.; DE ASSIS, H. C. S. Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.139, p. 291-300, mai. 2017a.

GUILOSKI, I. C.; RIBAS, J. L. C.; PIANCINI, L. D. S.; DAGOSTIM, A. C.; CIRIO, S. M.; FÁVARO, L. F.; BOSCHEN, S. L.; CESTARI, M. M.; DA CUNHA, C.; DE ASSIS, H. C. S. Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 111-120, jul. 2017b.

GUMPU, M. B.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U. M.; RAYAPPAN, J. B. B. A review on detection of heavy metal ions in water – an electrochemical approach. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 213, p. 515-533, jul. 2015.

HAFEMAN, D. G.; SUNDE, R. A.; HOEKSTRA, W. C. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **Journal of Nutrition**. v. 104, n. 5, p. 580-587, mai. 1974.

HANDY, R. D.; DEPLEDGE, M. H. Physiological Responses: Their Measurement and Use as Environmental Biomarkers in Ecotoxicology. **Ecotoxicology**. v. 8, n. 5, p. 329-349, out. 1999.

HOLLIS, L.; MCGEER, J. C.; MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 101-119, jul. 1999.

JAMAKALA, O.; RANI, U. A. Amelioration Effect of Zinc and Iron Supplementation on Selected Oxidative Stress Enzymes in Liver and Kidney of Cadmium-Treated Male Albino Rat. **Toxicology International**, v. 22, n. 1, p. 1-9, jan./abr., 2015.

JEMEC, A.; DROBNE, D.; TIŠLER, T.; SEPČIĆ, K. Biochemical biomarkers in environmental studies—lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 3, p. 571-581, abr. 2009.

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384-389, mai. 1992.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, out. 1976.

KIDO, S.; FUJIHARA, M.; NOMURA, K.; SASAKI, S.; MUKAI, R.; OHNISHI, R.; KANEKO, I.; SEGAWA, H.; TATSUMI, S.; IZUMI, H.; KOHNO, K.; MIYAMOTO, K. Molecular Mechanisms of Cadmium-Induced Fibroblast Growth Factor 23 Upregulation in Osteoblast-Like Cells. **Toxicological Sciences**, v. 139, n. 2, p. 301-316, jun. 2014.

KOCHHANN, D.; PAVANATO, M. A.; LLESUY, S. F.; CORREA, L. M.; RIFFEL, A. P. K.; LORO, V. L.; MESKO, M. F.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Bioaccumulation and oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. **Chemosphere**, v. 77, n. 3, p. 384-391, out. 2009.

LEITEMPERGER, J.; MENEZES, C.; SANTI, A.; MURUSSI, C.; LÓPES, T.; COSTA, M.; NOGUEIRA, L. S.; LORO, V. L. Early biochemical biomarkers for zinc in silver catfish (*Rhamdia quelen*) after acute exposure. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 1005-1014, jun. 2016.

LI, Y.; YANG, H.; LIU, N.; LUO, J.; WANG, Q.; WANG, L. Cadmium Accumulation and Metallothionein Biosynthesis in Cadmium-Treated Freshwater Mussel *Anodonta woodiana*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. fev. 2015.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, out./dez. 2010.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, dez. 2014.

MANEVSKI, N.; BALAVENKATRAMAN, K. K.; BERTSCHI, B.; SWART, P.; WALLES, M.; CAMENISCH, G.; SCHILLER, H.; KRETZ, O.; LING, B.; WETTSTEIN, R.; SCHAEFER, D. J.; POGNAN, F.; WOLF, A.; LITHERLAND, K. Aldehyde Oxidase Activity in Fresh Human Skin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 42, n. 12, p. 2049-2057, dez. 2014.

MELA, M.; GUILOSKI, I. C.; DORIA, H. B.; RANDI, M. A. F.; RIBEIRO, C. A. O.; PEREIRA, L.; MARASCHI, A. C.; PRODOCIMO, V.; FREIRE, C. A.; DE ASSIS, H. C. S. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 13-21, jul. 2013a.

MELA, M.; GUILOSKI, I. C.; DORIA, H. B.; Rabitto, I. S.; da Silva, C. A.; MARASCHI, A. C.; PRODOCIMO, V.; FREIRE, C. A.; RANDI, M. A. F.; RIBEIRO,

C. A. O.; DE ASSIS, H. C. S. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 108-116, fev. 2013b.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 370–374, jun. 2002.

MUÑOZ, L.; WEBER, P.; DRESSLER, V.; BALDISSEOTTO, B.; VIGLIANO, F. A. Histopathological biomarkers in juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to a sublethal lead concentration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 241-247, mar. 2015.

MURUSSI, C. R.; COSTA, M.; MENEZES, C.; LEITEMPERGER, J.; GUERRA, L.; LÓPES, T.; SEVERO, E.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Integrated Assessment of Biomarker Response in Carp (*Cyprinus carpio*) and Silver Catfish (*Rhamdia quelen*) Exposed to Clomazone. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, n. 4, p. 646-654, mai. 2015.

MURUSSI, C. R.; COSTA, M. D.; LEITEMPERGER, J. W.; GUERRA, L.; RODRIGUES, C. C. R.; MENEZES, C. C.; SEVERO, E. S.; FLORES-LOPES, F.; SALBEGO, J.; LORO, V. L. Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 445-455, abr. 2016.

MUSACCHIO, E.; PERISSINOTTO, E.; SARTORI, L.; VERONESE, N.; PUNZI, L.; ZAMBON, S.; MANZATO, E.; BAGGIO, G.; CORTI, M.; CREPALDI, G.; RAMONDA, R. Hyperuricemia, Cardiovascular Profile, and Comorbidity in Older Men and Women: The Pro.V.A. Study. **Rejuvenation Research**, v. 20, n. 1, p. 42-49, fev. 2017.

MUSSALI-GALANTE, P.; TOVAR-SÁNCHEZ, E.; VALVERDE, M.; DEL CASTILLO, E. R. Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, México, v. 29, n. 1, p. 117-140, fev. 2013.

MUTO, N.; REN, H. W.; HWANG, G. S.; TOMINAGA, S.; ITOH, N.; TANAKA, K. Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by airpumping stress, dexamethasone, and metals. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 122, n. 1, p. 75-82, jan. 1999.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como Instrumentos Preventivos de Poluição. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (1 Ed.). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Paulo: RIMA, 2006. p. 413-432.

NISHIYAMA, Y.; IKEDA, H.; HARAMAKI, N.; YOSHIDA, N.; IMAIZUMI, T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. **American Heart Journal**, v. 135, n. 1, p. 115-120, jan.1998.

OMER, S. A.; ELOBEID, M. A.; FOUAD, D.; DAGHESTANI, M. H.; AL-OLAYAN, E. M.; ELAMIN, M. H.; VIRK, P.; EL-MAHASSNA, A. Cadmium Bioaccumulation and Toxicity in Tilapia Fish (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 10, p. 1601-1606, 2012.

PAMPLONA, J. H. **Avaliação dos efeitos tóxicos da dipirona sódica em peixe *Rhamdia quelen***: estudo bioquímico, hematológico e histopatológico. 70 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PAMPLONA, J. H.; OBA, E. T.; DA SILVA, T. A.; RAMOS, L. P.; RAMSDORF, W. A.; CESTARI, M. M.; RIBEIRO, C. A. O.; ZAMPRONIO, A. R.; DE ASSIS, H. C. S. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 342-349, mar. 2011.

PEDRO, S.; DUARTE, B.; CASTRO, N.; ALMEIDA, P. R.; CAÇADOR, I.; COSTA, J. L. The Lusitanian toadfish as bioindicator of estuarine sediment metal burden: The influence of gender and reproductive metabolism. **Ecological Indicators**, v. 48, p. 370-379, jan. 2015.

PEREIRA, E. R.; COGO, A. J. D.; CRUZ, Z. M. A. Biomarcadores enzimáticos em *Holothuria grisea* (Selenka, 1867) expostas ao chumbo, cádmio e cobre. **Natureza on line**, v.12, n. 1, p. 1-9, jan./mar. 2014.

PEREIRA, L. S. **Efeitos do cádmio em parâmetros bioquímicos, genotóxicos, hematológicos e histológicos de *Rhamdia quelen***. 59 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

PEREIRA, L. S.; RIBAS, J. L. C.; VICARI, T.; SILVA, S. B.; STIVAL, J.; BALDAN, A. P.; DOMINGOS, F. X. V.; GRASSI, M. T.; CESTARI, M. M.; DE ASSIS, H. C. S. Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 29-36, ago. 2016.

PRETTO, A.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; CLASEN, B.; HOEHNE, L.; DRESSLER, V. Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 4, p. 1008-1014, mai. 2010.

PRETTO, A.; LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; CATTANEO, R.; CLASEN, B.; FINAMOR, I. A.; DRESSLER, V. Effects of water cadmium concentrations on bioaccumulation and various oxidative stress parameters in *Rhamdia quelen*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 309-318, fev. 2011.

PRETTO, A.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; SANTI, A.; TONI, C. Alterations in carbohydrate and protein metabolism in silver

catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 188-192, fev. 2014.

RAHIMZADEH, M. R.; RAHIMZADEH, M. R.; KAZEMI, S.; MOGHADAMNIA, A. Cadmium toxicity and treatment: An update. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 8, n. 3, p. 135-145, jun. 2017.

RAMSDORF, W. A.; GUIMARÃES, F. S. F.; FERRARO, M. V. M.; GABARDO, J.; TRINDADE, E. S.; CESTARI, M. M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research**, v. 673, n. 1, p. 78-81, fev. 2009.

REMOUNDOU, K.; KOUNDOURI, P. Environmental Effects on Public Health: An Economic Perspective. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, n. 8, p. 2160-2178, jul. 2009.

ROE, F. J. C.; DUKES, C. E.; CAMERON, K. M.; PUGH, R. C. B.; MITCHLEY, B. C. V. Cadmium neoplasia: testicular atrophy and leydig cell hyperplasia and neoplasia in rats and mice following the subcutaneous injection of cadmium salts. **British Journal of Cancer**, v.18, n. 4, p. 674-681, dez. 1964.

ROMÉO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J. P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 2/3, p. 185-194, mar. 2000.

ROMERO-ISART, N.; VAŠÁK, M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 88, n. 3/4, p. 388-396, fev. 2002.

ROMERO-PUERTAS, M. C.; PALMA, J. M.; GÓMEZ, M.; DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. **Plant, Cell & Environment**. v. 25, p. 677-686, 2002.

ROSSI, F.; PALOMBELLA, S.; PIRRONE, C.; MANCINI, G.; BERNARDINI, G.; GORNATI, R. Evaluation of tissue morphology and gene expression as biomarkers of pollution in mussel *Mytilus galloprovincialis* caging experimente. **Aquatic Toxicology**, v. 181, p. 57-66, dez. 2016.

RYAN, J. A.; HIGHTOWER, L. E. Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. **Experientia Supplementum**, v. 77, p. 411-424, 1996.

SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J. A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 5, p. 2721-2725, mai. 2013.

SANTOS, D. R. **Uso de biomarcadores na avaliação da resposta de peixes à poluição aquática nos reservatórios do Iraí e Passaúna**. 94 f. Dissertação

(Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, out. 1968.

SHEN, Y.; SANGIAH, S. Na⁺, K⁺-ATPase, Glutathione, and Hydroxyl Free Radicals in Cadmium Chloride-Induced Testicular Toxicity in Mice. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 174-179, ago. 1995.

SOBJAK, T. M.; ROMÃO, S.; DO NASCIMENTO, C. Z.; DOS SANTOS, A. F. P.; VOGEL, L.; GUIMARÃES, A. T. B. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of fish *Rhamdia quelen*. **Chemosphere**, v. 182, p. 267-275, set. 2017.

SON, Y.; LEE, J.; HITRON, J. A.; PAN, J.; ZHANG, Z.; SHI, X. Cadmium Induces Intracellular Ca²⁺- and H₂O₂-Dependent Apoptosis through JNK- and p53-Mediated Pathways in Skin Epidermal Cell line. **Toxicological Sciences**, v. 113, n. 1, p. 127-137, jan. 2010.

SOUZA, A.M.; SALVIANO, A. M.; MELO, J. F. B.; FELIX, W. P.; BELÉM, C. S.; RAMOS, P. N. Seasonal study of concentration of heavy metals in waters from lower São Francisco River basin, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 76, n. 4, p. 967-974, out./dez. 2016.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. In KEOHAVONG, P.; GRANT, S. G. **Methods in Molecular Biology**, Molecular Toxicology Protocols - Humana Press Inc., Totowa, v. 291, 2005.

STARK, G. Functional Consequences of Oxidative Membrane Damage. **The Journal of Membrane Biology**, v. 205, n. 1, p. 1-16, mai. 2005.

SURESH, A.; MEENA, B.; SUMIT, R.; MANI, R. Induction of metallothionein with cadmium chloride in a economically important freshwater fish-grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844). **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 5, p. 276-281, set./out. 2015.

SUWALSKY, M.; VILLENA, F.; NORRIS, B.; CUEVAS, F.; SOTOMAYOR, C. P. Cadmium-induced changes in the membrane of human erythrocytes and molecular models. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 6, p. 1061-1066, jun. 2004.

VALENTE, D.; COSTA-AMARAL, I. C.; DE CARVALHO, L. V. B.; DOS SANTOS, M. V. C.; DE CASTRO, V. S.; RODRIGUES, D. R. F.; DE FALCO, A.; SILVA, C. B.; NOGUEIRA, S. M.; GONÇALVES, E. S.; MOREIRA, J. C.; ANDRÉ, L. C.; TEIXEIRA, L. R.; SARCINELLI, P. N.; SISENANDO, H. A.; DE OLIVEIRA, M. S.; PERINI, J. A.; MATTOS, R. C. O. C.; LARENTIS, A. L. Utilização de

biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, São Paulo, v. 42, supl 1, abr. 2017.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, fev. 2003.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, v. 44, n. 1, p. 69-84, jul. 1997.

VICENTINI, M. **Cádmio e seu potencial efeito tóxico em fêmeas de *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae), com ênfase no eixo reprodutivo**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

WANG, Y.; DENG, X.; HEWAVITHARANA, T.; SOBOLOFF, J.; GILL, D.L. Stim, ORAI and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 9, p. 1127-1133, set. 2008.

WANG, J.; ZHANG, H.; ZHANG, T.; ZHANG, R.; LIU, R.; CHEN, Y. Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 59-67, jun. 2015.

WELCH, K. D.; DAVIS, T. Z.; VAN EDEN, M. E.; AUST, S. D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecule. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 7, p. 577-583, abr. 2002.

WILTEMBURG, F. **Especiação de metais em ambientes aquáticos utilizando dispositivos DGT modificados: aplicação em ensaios de toxicidade frente a peixes**. 94f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

WRIGHT, D. A.; WELBOURN, P. A. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. **Environmental Review**, v. 2, n. 2, p. 187-214, 1994.

ZENG, G.; CHEN, A.; CHEN, G.; HU, X.; GUAN, S.; SHANG, C.; LU, L.; ZOU, Z. Responses of *Phanerochaete chrysosporium* to Toxic Pollutants: Physiological Flux, Oxidative Stress, and Detoxification. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 14, p. 7818-7825, jul. 2012.

ŽIKIĆ, R. V.; ŠTAJN, A. Š.; PAVLOVIĆ, S. Z.; OGNJANOVIĆ, B. I.; SAIĆIĆ, Z. S. Activities of Superoxide Dismutase and Catalase in Erythrocytes and Plasma Transaminases of Goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) Exposed to Cadmium. **Physiology Research**, v. 50, n. 1, p. 105-111, 2001.